



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003184

(51)⁷ **C07J 3/005; C12P 33/02**

(13) **Y**

(21) 2-2022-00510

(22) 10/06/2019

(67) 1-2019-03053

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/12/2020 393

(73) Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lưu Đức Huy (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỢP CHẤT ANDROST-4,9(11)-DIEN-3,17-DION TỪ PHỤ
PHẨM TINH LUYỆN DẦU ĐẬU TƯƠNG**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hợp chất androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ -AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương bao gồm các bước sau: (i) Thủy phân phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương để thu được sản phẩm thô, tinh chế sản phẩm thô để thu được phytosterol; (ii) Chuyển hóa phytosterol thành androstendion; (iii) Chuyển hóa androstendion thành 9 α -hydroxy androstendion; và (iv) Tổng hợp androst-4,9(11)-dien-3,17-dion.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa-dược. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hợp chất steroid, cụ thể là androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ -AD) thông qua phytosterol, androstendion (AD) và 9 α -hydroxy androstendion (9 α -OH AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chế phẩm steroid có thể được xếp vào loại dược phẩm được tiêu thụ rộng rãi nhất và ngày càng tăng trong ngành công nghiệp dược thế giới, được sử dụng làm thuốc chữa rất nhiều bệnh khác nhau vì chúng có phổ hoạt tính rất rộng, nhiều trường hợp là liệu pháp không thể thay thế: thuốc kháng viêm, tăng cường miễn dịch, sử dụng trong sinh đẻ có kế hoạch tránh thụ thai và chữa vô sinh, thuốc lợi tiểu, chống lão hoá, tác nhân đồng hoá. Chúng cũng được ứng dụng thành công trong điều trị ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tủy xương, ung thư máu, điều trị loãng xương cũng như tác nhân thay thế trong điều trị chứng thiếu hormone tuyến thượng thận, trong việc ngăn chặn bệnh nhồi máu cơ tim, tác nhân kháng nấm, là thành phần có hoạt tính chống béo phì, ngăn chặn và xử lý lây nhiễm HIV, phối chế thuốc điều trị bệnh AID.

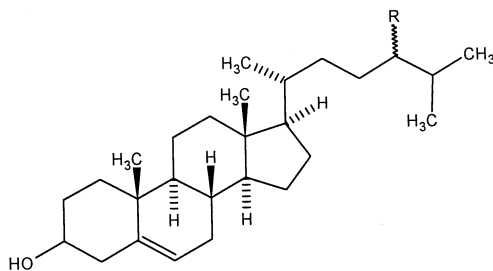
Trên thế giới đang có xu hướng mới sử dụng sterol thực vật (phytosterol) được thu hồi từ phế phụ thải công nghiệp giấy, công nghiệp mía đường và công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương với giá thành rất rẻ thay thế cho nguyên liệu truyền thống diosgenin (chiết từ các cây *dioscorea* (củ mài), *costus* (mía giò)) và solasodin (chiết từ cây *solanum* (cà)) giá thành ngày càng cao vì phải trồng trên đất nông nghiệp nhiều năm (4-5 năm) mới có thể thu hoạch. Ngoài ra, các cây này phát triển và cho năng suất tốt chỉ ở một vài nơi trên thế giới (chẳng hạn như Mê-Hi-Cô, Ấn Độ,...), ở Việt Nam các loài cây này không thích hợp để trồng vì giống bị thoái hóa nhanh chóng, năng suất thấp. Điều này trở thành hiện thực nhờ việc tạo ra một số chủng vi sinh đột biến phân cắt oxy hóa chọn lọc mạch nhánh sterol, hỗn hợp phytosterol đến các hợp chất 17- keto steroid như androstendion (AD), androstadiendion (ADD), 9 α - OH AD.

Hiện nay, AD và 9 α - OH AD đang được nghiên cứu mạnh mẽ làm nguyên liệu ban đầu để tổng hợp các loại thuốc gốc steroid, trong số đó có seri thuốc cao cấp

hormoncocticoit như dexamethason, các dẫn xuất của dexamethason, prednisolon, 6 α -metyl prednisolon, betamethason, v.v.. Trong khi đó, trong các sơ đồ đã biết tổng hợp các thuốc này dùng 9 α -OH AD làm nguyên liệu đầu, nhóm hydroxy ở vị trí C(9) được loại bỏ ngay từ đầu để tạo thành nối đôi $\Delta^{9(11)}$ -, vì nhóm 9 α -hydroxy rất nhạy cảm trong các điều kiện phản ứng. Do vậy, sáng chế này đề xuất quy trình điều chế trực tiếp $\Delta^{9(11)}$ -androstendion từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương và sử dụng ngay làm nguyên liệu đầu cho tổng hợp các hormon cocticoit. Điều này làm tăng hiệu quả của toàn bộ dây chuyền công nghệ sản xuất thuốc.

Phytosterol và AD còn được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất thực phẩm và thuốc.

Phương pháp thu hồi, tinh chế phytosterol từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương thông thường



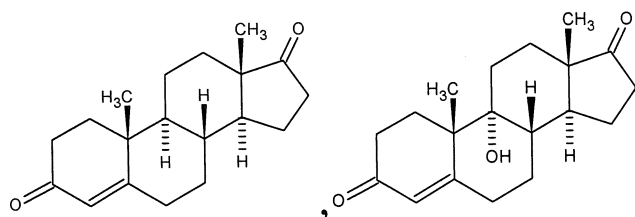
Phytosterol (R=-C₂H₅)

Các giải pháp gần nhất với sáng chế thực hiện thu hồi, tinh chế phytosterol từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương bao gồm các giai đoạn chung sau: Thủy phân nguyên liệu phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương có chứa sterol bằng dung dịch kiềm- nước có bổ sung 30-70% ancol bậc thấp (MeOH, EtOH, v.v.) ở nhiệt độ sôi của hỗn hợp, sau đó trung hòa bằng dung dịch axit sulfuric đến trung tính, trích ly phần dầu tách ra có chứa phytosterol, tinh chế phytosterol bằng phương pháp kết tinh chọn lọc (xem các công bố patent số US2843610, Bioresource Technology, 2007, 98, 2335; và US2715639, US2729656; US2729655).

Phương pháp vi sinh chuyển hóa phytosterol đến AD và 9 α -OH AD

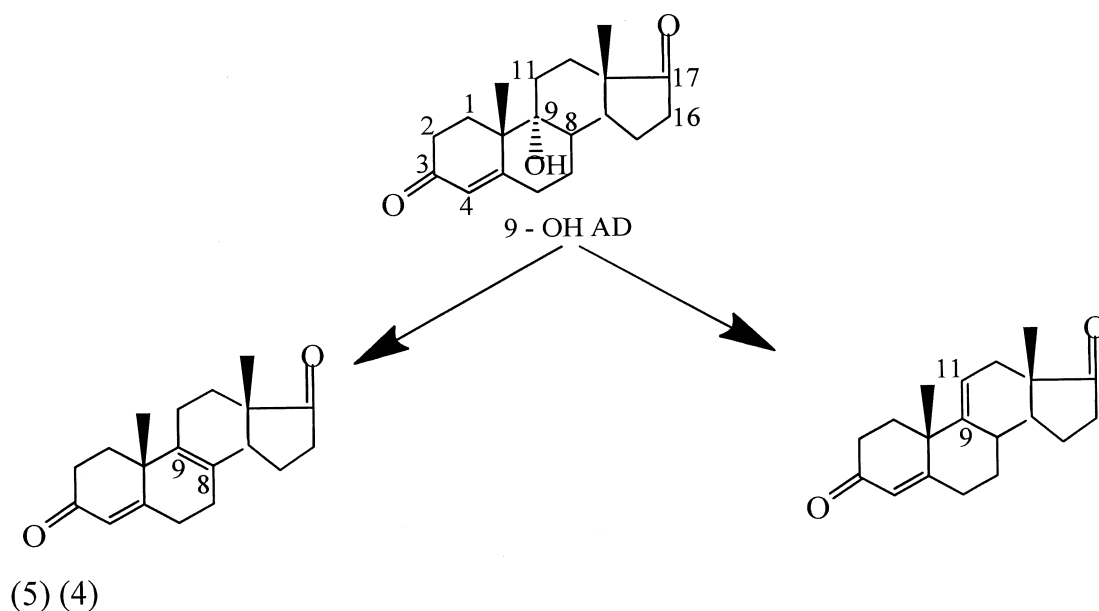
Đã biết các phương pháp vi sinh phân cắt oxy hóa chọn lọc mạch nhánh hỗn hợp phytosterol đến 17-ketosteroid như Δ^4 -3,17-diketo-androstendion (AD), 9 α -OH AD (xem App. Biochem. Microbiol., 2011, 43 (3), 297-301; Biochim. Biophys. Acta, 1978, 539, 308; US4035236, 1977; US4175006, 1979; US4397946, 1983; DD298278, 1992; DD298279, 1992; RU2077590, 1997; App. Microbiol. Biotechnol., 2005, 67(5), 671-

687; J.Chem. Technol., 2005,80,55-60.v.v..). Tuy nhiên, phần lớn các phương pháp này không được mô tả đủ chi tiết.



Androstendion (AD) 9 α -OH AD

Phương pháp dehydrat hóa 9 α -OH AD: tổng hợp $\Delta^{9(11)}$ -AD



Sơ đồ 1. Dehydrat hóa 9 α -hydroxy androstendion

Điểm đáng lưu ý của phản ứng dehydrat hóa 9 α -OH AD là khả năng tạo thành đồng phân andros-4,8(9)-dien-3,17-dion ($\Delta^{8(9)}$ -AD (5)). Đồng phân này có giá trị R_f tương tự Δ^9 -AD trên sắc ký bản mỏng (TLC) và không thể tách khỏi nhau bằng phương pháp kết tinh. Nhận biết đồng phân $\Delta^{8(9)}$ -AD trong hỗn hợp sản phẩm có thể được thực hiện, ví dụ, bằng các phương pháp phổ ^1H , ^{13}C -NMR (xem công bố patent số EP0253415, 1988; EP0294911, 1988), hoặc bằng sắc ký lỏng cao áp HPLC (xem công bố patent số EP0253415, 1988; EP0294911, 1988), sắc ký khí GC (xem công bố patent số US4102907, 1978).

Tác nhân dehydrat hóa có thể sử dụng bao gồm axit vô cơ, axit hữu cơ, anhydrit hoặc axit clohydric hữu cơ và vô cơ và các tác nhân khác.

Phản ứng dehydrat hóa 9α -OH AD để tổng hợp $\Delta^{9(11)}$ -AD sử dụng tác nhân dehydrat hóa có thể được tiến hành trong một dung môi hữu cơ hoặc không cần sử dụng dung môi.

Dung môi sử dụng được khuyến dùng là một dung môi hữu cơ trơ không proton, đặc biệt là các hydrocacbon thơm (chẳng hạn như benzen, toluen) hoặc các hydrocacbon chứa Clo (Vd. CH_2Cl_2 , CHCl_3 , $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$). Tác nhân dehydrat hóa sử dụng là các axit vô cơ chứa H_2O , đặc biệt là axit H_3PO_4 , H_2SO_4 hoặc HClO_4

Phương pháp dehydrat hóa 9α -OH AD tổng hợp $\Delta^{9(11)}$ -AD đã biết có sử dụng dung môi hữu cơ (các hydrocacbon chứa clo, các hydrocacbon thơm, các ete vòng, các bazơ hữu cơ). Tuy nhiên, tác nhân dehydrat hóa là ofany N, N1-tional-diimidazon được tạo thành từ SOCl_2 và imidazol (dung môi THF) hoặc p-TSA (dung môi benzen) (xem Chem. and Ind., 1961, 1530]; hoặc sử dụng silicagel hấp phụ axit sulfonic hữu cơ (dung môi hydrocacbon thơm) (xem EP0253415, 1988); hoặc axit Lewis: sắt clorua, titan tetraclorua và hỗn hợp của chúng với silicagel trong một dung môi hữu cơ trơ (xem EP0294911, 1988); hoặc axit closulfonic (dung môi CH_2Cl_2) (xem US4127596, 1978, Vd. 1-8].

Một chi tiết quan trọng của giải pháp này là việc sử dụng tác nhân dehydrat hóa là các axit vô cơ chứa H_2O , đặc biệt là axit H_3PO_4 , H_2SO_4 hoặc axit HClO_4 .

Một phương pháp điều chế các $\Delta^{9(11)}$ -steroit của một số các androstan, bao gồm $\Delta^{9(11)}$ -AD, phản ứng của 9α -hydroxysteroit (đặc biệt là 9α -OH AD) với axit chứa oxy không thơm có $\text{pKa} \leq 1,0$ [US4127596, 1978]. Đó là axit được lựa chọn từ nhóm các axit closulfonic, sulfuric, phosphoric, metansulfonat, perlina và triperoxonan. Phản ứng được tiến hành trong môi trường axit chứa oxy.

Một phương pháp đã biết tổng hợp $\Delta^{9(11)}$ -AD từ 9α -OH AD sử dụng axit polyphosphoric (xem HUT36138, 1985). Điểm không thuận lợi của phương pháp dehydrat hóa này là sử dụng tác nhân dehydrat hóa có mặt của H_2O , sử dụng quá dư tác nhân dehydrat hóa, thời gian phản ứng dài, trong hầu hết các trường hợp đều phải sử dụng sắc ký cột để tinh chế sản phẩm, do đó hoặc là hiệu suất thấp hoặc là sản phẩm không sạch.

Phân tích các tài liệu tham khảo về phản ứng dehydrat hóa 9α -OH AD chỉ ra rằng việc thực hiện phản ứng trong một dung môi hữu cơ đặc biệt là các hydrocacbon thơm hoặc các hydrocacbon chứa Clo, sử dụng các axit vô cơ chứa H_2O là chưa được mô tả.

Những mô tả về cách tiến hành phản ứng với các axit hữu cơ hoặc dẫn xuất của chúng, anhydrit hoặc axit chlorit vô cơ, môi trường khan là một điều kiện phản ứng, cho một kết quả khả quan. Theo như các tài liệu trước đó, việc sử dụng các axit vô cơ chứa H_2O để có thể nhận được $\Delta^{9(11)}$ -AD trong quá trình dehydrat hóa 9α -OH AD mà không sử dụng dung môi hữu cơ, tuy nhiên, những phương pháp này có nhiều nhược điểm và các kết quả nhận được là không thỏa đáng.

Trong các tài liệu tham khảo không có thông tin về phản ứng dehydrat hóa 9α -OH AD tạo thành $\Delta^{9(11)}$ -AD sử dụng tác nhân dehydrat hóa là các axit vô cơ chứa H_2O trong dung môi hữu cơ trơ không proton.

Thêm nữa, trong các tài liệu tham khảo không có thông tin về việc thúc đẩy phản ứng dehydrat hóa, đó là loại bỏ lượng H_2O dư trong phản ứng dehydrat hóa, bằng phương pháp chưng cất đẳng phí.

Các giải pháp đã được biết không mô tả đầy đủ và chi tiết tất cả các quá trình điều chế $\Delta^{9(11)}$ -AD từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương như trong sáng chế này. Sáng chế mô tả quy trình sản xuất 4 thương phẩm steroid dùng trong lĩnh vực y dược: phytosterol, androstendion (AD), 9α -hydroxy androstendion (9α -OH AD) và androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ -AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương khắc phục được các hạn chế trong các phương pháp nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đưa ra quy trình sản xuất hợp chất steroid, cụ thể là androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ -AD) thông qua phytosterol, androstendion (AD) và 9α -hydroxy androstendion (9α -OH AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương, sau khi đã nghiên cứu, phân tích các nguồn tài liệu tham khảo có được ở trên, tác giả của sáng chế đã lựa chọn các phương pháp hiệu quả khả thi nhất, tiến hành đơn giản hóa, giảm thiểu các giai đoạn, nâng cao hiệu suất từng giai đoạn.

Quy trình theo sáng chế sản xuất hợp chất steroid androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ -AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương bao gồm các bước sau:

- (i) Thủy phân phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương để thu được sản phẩm thô, tinh chế sản phẩm thô để thu được phytosterol.
- (ii) Chuyển hóa phytosterol thành androstendion.
- (iii) Chuyển hóa androstendion thành 9α -hydroxy androstendion.

(iv) Tổng hợp androst-4,9(11)-dien-3,17-dion bằng cách dehydrat hóa 9 α -hydroxy androstendion sử dụng axit vô cơ H₂SO₄/H₃PO₄/HClO₄ trong dung môi hữu cơ không proton.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 biểu diễn phổ HPLC của sản phẩm AD thu được từ bước (ii) của quy trình theo sáng chế có độ tinh sạch ~ 100%

Hình 2 biểu diễn phổ HPLC của sản phẩm 9 α -OH AD thu được từ bước (iii) của quy trình theo sáng chế có độ tinh sạch ~ 100%

Hình 3 biểu diễn biểu diễn phổ HPLC của chất chuẩn 9 α -OH AD

Hình 4 biểu diễn phổ HPLC của sản phẩm thô 9 α -OH AD ở quy mô 5,0L

Hình 5 biểu diễn phổ HPLC của sản phẩm tinh chế 9 α -OH AD ở quy mô 5,0L

Hình 6 biểu diễn phổ HPLC của sản phẩm thô 9 α -OH AD ở quy mô 80L

Hình 7 biểu diễn phổ HPLC của sản phẩm 9 α -OH AD ở quy mô 80L

Hình 8 biểu diễn phổ IR của hỗn hợp phytosterol đậu tương phân lập từ phụ thải công nghiệp dầu đậu tương Cái Lân- Quảng Ninh

Hình 9 biểu diễn phổ HPLC của hỗn hợp phytosterol đậu tương phân lập từ phụ thải công nghiệp dầu đậu tương Cái Lân- Quảng Ninh

Hình 10 biểu diễn phổ MS của β -sitosterol

Hình 11 biểu diễn phổ MS của stigmasterol

Hình 12 biểu diễn phổ MS của campesterol

Mô tả chi tiết sáng chế

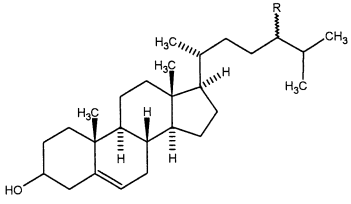
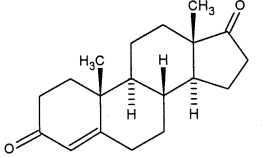
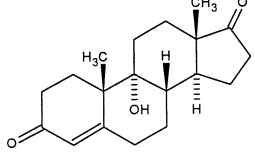
Thay vì trong các tài liệu tham khảo khác, nhiều giai đoạn của quy trình không được mô tả chi tiết, tác giả sáng chế này đặt ra mục tiêu mô tả đầy đủ, chi tiết tất cả các giai đoạn của quy trình. Quy trình theo cho hiệu suất cao, không có sản phẩm phụ và phương pháp tinh chế đủ đơn giản, cụ thể là không cần sử dụng kỹ thuật tinh chế cột sắc ký, khả thi để triển khai vào sản xuất công nghiệp. Trên thực tế, quy trình theo sáng chế bền vững và đã được triển khai thử nghiệm thành công nhiều lần ở quy mô pilot 80L (xem Ví dụ thực hiện sáng chế); hàng trăm kg phytosterol đã được sản xuất và ứng dụng trong thực tiễn. Các hợp chất khác là sản phẩm của sáng chế như androstendion (AD), 9 α -hydroxy androstendion (9 α -OH AD) và androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ - AD) đã được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu trong nghiên cứu tổng hợp các hợp chất steroid làm thuốc như prednisolon, axetat dexamethason, testosterone, betamethason.

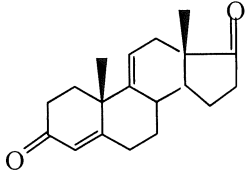
Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong quy trình sản xuất hợp chất steroid: androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^9(11)$ - AD) thông qua phytosterol, androstendion (AD) và 9α -hydroxy androstendion (9α -OH AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương theo sáng chế bao gồm chủng *Mycobacterium neoaurum*, *Rhodococcus erythropolis*, đây là các chủng được phân lập từ tự nhiên và hiện được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng *Mycobacterium neoaurum* là một chủng vi khuẩn kháng axit, trực khuẩn, không gây bệnh đối với động vật thân nhiệt, được bảo quản trong môi trường nitơ lỏng tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ MN001.

Chủng *Rhodococcus erythropolis* là một loài vi khuẩn hiếu khí, không gây bệnh đối với động vật thân nhiệt, được bảo quản trong môi trường nitơ lỏng tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam với số lưu giữ RE001.

Quy trình theo sáng chế được tóm tắt trong sơ đồ 2 dưới đây :

 Phytosterol R= C₂H₅ (1)	→	 Androstendion (AD) (2)	→	 9α - OH AD (3)
↑				↓
(Nguyên liệu) Phụ phẩm công nghiệp				

tinh luyện dầu đậu tương				 Δ⁹⁽¹¹⁾-AD (4)
--------------------------	--	--	--	---

Sơ đồ 2. Sơ đồ sản xuất phytosterol, AD, 9α-OH AD và Δ⁹⁽¹¹⁾-AD

từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương

Như vậy, quy trình theo sáng chế sản xuất hợp chất steroid: androst-4,9(11)-dien-3,17-dion (Δ⁹⁽¹¹⁾-AD) từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương gồm 4 công đoạn sau:

Công đoạn 1: Chiết xuất tinh chế phytosterol từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương: Thủy phân bằng dung dịch 50% NaOH/ H₂O), có bổ sung ancol bậc thấp (30-70%) – Trung hòa bằng dung dịch axit 25% H₂SO₄– Trích ly phân lập sản phẩm thô – Tinh chế phytosterol bằng phương pháp kết tinh chọn lọc từ dung môi.

Việc bổ sung ancol bậc thấp vào hỗn hợp thủy phân nhằm tăng độ tan và giảm nhiệt độ quá trình thủy phân. Vì giá cả MeOH và EtOH công nghiệp không khác nhau nhiều, nên dùng MeOH cho hiệu suất tốt hơn.

Dung môi tinh chế phytosterol: Dùng EtOH giá rẻ và ít độc hại nhưng hiệu suất thu hồi rất thấp, sản phẩm dạng bột xốp nhẹ, độ tinh khiết không đạt cho giai đoạn chuyển hóa vi sinh tiếp theo. Để có hiệu suất kết tinh cao ≥ 95%, độ tinh sạch của sản phẩm ≥ 97% đạt tiêu chuẩn cho chuyển hóa vi sinh, cần sử dụng hỗn hợp dung môi kết tinh chọn lọc là: (CH₃)₂CO/MeOH 96%/H₂O (50:40:10 (v/v/v)).

Trên thực tế, ngoài phytosterol, từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương còn thu được các thứ phẩm rất có giá trị sử dụng trong y học như tocopheron (vitamin E), isoflavon.

Công đoạn 2: Phân cắt chọn lọc mạch nhánh hỗn hợp phytosterol đến androstendion bằng chủng vi sinh *Mycobacterium neoaurum* MN001

Phương pháp chuyển hóa hỗn hợp phytosterol bằng chủng vi sinh *Mycobacterium neoaurum* MN001 được mô tả chi tiết qua các ví dụ của sáng chế.

Vì phytosterol tan rất kém trong môi trường nước, nên nguyên liệu cần được nghiền nhỏ trên máy nghiền thông dụng; đồng thời thiết bị lên men được sử dụng là thiết

bị chuyên dụng có hệ thống cánh khuấy được cải tiến để làm giảm quá trình tạo bọt. Hiệu suất chuyển hóa vi sinh phytosterol đến androstendion đạt $\geq 70 \pm 5\%$. Độ tinh khiết của sản phẩm đạt $\geq 97\%$ (HPLC)

Công đoạn 3: Chuyển hóa vi sinh androstendion đến 9 α -hydroxy androstendion sử dụng chủng vi sinh Rhodococcus erythropolis RE001

Phương pháp chuyển hóa hỗn hợp phytosterol bằng chủng vi sinh *Rhodococcus erythropolis* được mô tả chi tiết qua các ví dụ của sáng chế. Có thể sử dụng thiết bị lên men thông dụng cho quá trình này. Hiệu suất chuyển hóa vi sinh androstendion đến 9 α -hydroxy androstendion đạt $\geq 70 \pm 5\%$. Độ tinh khiết của sản phẩm đạt $\geq 97\%$ (HPLC)

Công đoạn 4: Tổng hợp $\Delta^{9(11)}$ -androstendion: dehydrat hóa 9 α -hydroxy androstendion bằng tác nhân axit vô cơ như H_2SO_4 , H_3PO_4 , $HClO_4$ trong dung môi hữu cơ không proton.

Axit vô cơ được ưu tiên sử dụng trong sáng chế này vì giá thành rẻ và sản phẩm $\Delta^{9(11)}$ -androstendion nhận được đạt độ tinh khiết cao không chứa sản phẩm phụ $\Delta^{8(9)}$ -androstendion. Không cần triển khai dehydrat hóa trong dung môi thơm độc hại như benzen hay toluen, có thể triển khai quá trình dehydrat hóa trong dung môi không proton như CH_2Cl_2 , $CHCl_3$ hoặc triển khai trong môi trường không cần dung môi hữu cơ, trong trường hợp này cần sử dụng lượng tác nhân 10 lần lớn hơn. Sản phẩm dễ tinh chế bằng phương pháp kết tinh chọn lọc từ dung môi hữu cơ thông dụng

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất hợp chất $\Delta^{9(11)}$ -androstendion:

Công đoạn 1: Chiết xuất, tinh chế phytosterol từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương

i) Thủy phân

Nạp 3300g nguyên liệu phụ phẩm công nghiệp dầu đậu tương, 300g NaOH và 300g H_2O /100mL MeOH 96% (EtOH 96%) vào nồi phản ứng, có ống sinh hàn hồi lưu. Tiến hành khuấy đảo và hồi lưu 1,5 giờ. Để nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ phòng.

ii) Trung hòa, trích ly phân lập sản phẩm

Trung hòa hỗn hợp phản ứng bằng 1600mL H_2SO_4 25%. Sau đó để nguội. Đổ vào 1600mL H_2O , khuấy nhẹ, để yên. Tách lấy lớp dầu phía trên.

iii) Rửa sản phẩm thô

Rửa 3 lần dịch dầu sterol thô nhận được ở giai đoạn trên bằng H₂O ấm, mỗi lần khoảng 1600mL H₂O.

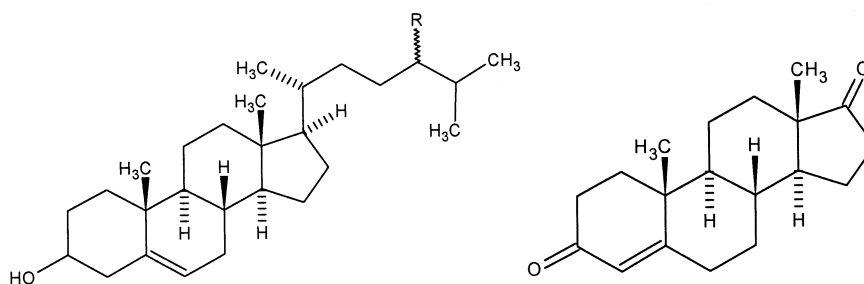
iv) *Tinh chế sản phẩm*

Toàn bộ dịch sterol thô được đổ vào bình chứa 1500mL hỗn hợp dung môi chọn lọc (CH₃)₂CO/MeOH 96%/H₂O (50:40:10 (v/v/v)). Hồi lưu 1,5 giờ. Để yên trong ngăn dưới tủ lạnh (~5°C) qua đêm. Lọc lấy sản phẩm trên phễu lọc xốp. Sấy trong tủ sấy chân không 3 giờ ở nhiệt độ 40-50°C. Thu được sản phẩm sạch

Kết tinh 3 lần bằng hỗn hợp dung môi chọn lọc trên hoặc có thể sơ bộ kết tinh lần đầu bằng EtOH 96%, sau đó kết tinh lại 2 lần nữa bằng hệ dung môi chọn lọc. Hỗn hợp phytosterol nhận được có độ tinh khiết 97% (HPLC)

Công đoạn 2: Chuyển hóa vi sinh phytosterol đến AD sử dụng chủng Mycobacterium neoaurum MN001

Sơ đồ chung:



Phytosterol (1) → Androstendion (AD) (2)

Sơ đồ 3. Chuyển hóa phytosterol đến AD sử dụng chủng Mycobacterium neoaurum MN001

Chủng *Mycobacterium neoaurum* MN001 được làm giàu trong môi trường nhân giống thích hợp trong thời gian 4 ngày rồi chuyển sang môi trường chuyển hóa theo tỷ lệ 10%, có bổ sung 1% phytosterol, nuôi ở 29°C, khuấy đảo 220 vòng/phút. Quá trình chuyển hóa kéo dài 3 ngày và được kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng sử dụng etyl axetat làm dịch chiết (tỷ lệ 1:4), chạy trong hệ dung môi n-hexan: axeton (tỷ lệ 3:2), soi dưới UV 254nm. Dịch nuôi cấy sau đó được tách chiết và tinh chế. Độ tinh sạch của AD được đánh giá bằng HPLC. Thành phần môi trường nhân giống và chuyển hóa cho chủng *Mycobacterium neoaurum* MN001 được dẫn ra trong *Bảng 1* dưới đây:

Môi trường nhân giống	(g/L)	Môi trường chuyển hóa	(g/L)
glucoza	10	glucoza	20

bột đậu tương không loại béo	3	bột đậu không loại béo	10
bột đậu tương loại béo	2	bột đậu tương loại béo	5
axit xitric	2,2	axit xitric	2,2
u-rê	0,5	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,5
NH ₄ Cl	1,0	u-rê	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5
MgSO ₄	0,5	FeSO ₄	0,05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05	CaCO ₃	3
CaCO ₃	1,5	Phytosterol	10
pH: 6,8 - 7,2		pH: 6,8 - 7,2	

*Bảng 1. Môi trường nhân giống và chuyển hoá của
chủng Mycobacterium neoaurum MN001*

Thử nghiệm chọn cơ chất và môi trường nuôi cấy tối ưu:

i) Thí nghiệm 1: Trước tiên, chủng *Mycobacterium neoaurum* MN001 được lên men trên cơ chất phytosterol nhập ngoại của Merck Ph- N°1 và môi trường của Nga ở quy mô bình tam giác dung tích 750mL chứa 100mL môi trường chuyển hóa. Kết thúc quá trình chuyển hóa, hàm lượng AD đánh giá theo sắc ký bản mỏng (TLC) là 5g/L. Từ 3g phytosterol ban đầu tách được 1,21g AD thô có độ tinh sạch kỹ thuật là 82,72%. Tinh chế tiếp theo thu được 1,105g AD có độ tinh sạch 97,85% theo HPLC, hiệu suất tinh chế đạt 94,85%.

ii) Thí nghiệm 2:

+ Cơ chất phytosterol nhập ngoại của Merck Ph- N°1 và môi trường của Nga: Từ 5g phytosterol thu được 3,01g AD thô có độ tinh sạch kỹ thuật 59,74% (HPLC) .

+ Cơ chất nhập ngoại của Merck Ph- N°1, môi trường mua tại Việt Nam: Sau 98 giờ, hàm lượng AD theo TLC đạt khoảng 4,5 g/L. Từ 6g phytosterol ban đầu thu được 3,22g AD thô có độ tinh sạch kỹ thuật 69,90% . Tinh chế cùng lượng AD thô ở thí nghiệm trên được 5,15g AD với độ tinh sạch đạt 105,83%, hiệu suất tinh chế là 85,12%.

+ Cơ chất phytosterol Việt Nam (Ph-VN), môi trường của Nga: Hiệu suất chuyển hóa AD tiếp tục được đánh giá qua thí nghiệm trên môi trường của Nga với hai mẫu cơ chất của Việt Nam (Ph-VN1 và Ph-VN2). Từ tổng cộng 10g phytosterol, sau 98 giờ chuyển hóa, hàm lượng AD đạt 4,4 g/L theo TLC, thu được 5,77g AD thô với độ tinh

sạch kỹ thuật trung bình là 70,08% theo HPLC. Lượng AD thô này tiếp tục được tinh chế thu được 4,91g AD có độ tinh sạch là 103,96%, hiệu suất tinh chế đạt 87,37%.

iii) Thí nghiệm 3: Thí nghiệm với phytosterol nhập ngoại Merck trên môi trường của Nga và Việt Nam

+ Môi trường phản ứng của Nga: Từ 4g phytosterol MerckPh-N⁰2, sau 96 giờ chuyển hóa đánh giá hàm lượng AD đạt ~ 5,2 g/L theo TLC, chiết được 2,71g AD thô, độ tinh sạch kỹ thuật là 75,27%.

+ Môi trường phản ứng của Việt Nam: Tương tự, từ 4g phytosterol Merck Ph-N⁰2 trên sau 96 giờ chuyển hóa, dịch nuôi cấy có hàm lượng AD theo TLC đạt khoảng 4,7 g/L được chiết và thu được 2,31g AD thô. Phân tích bằng HPLC cho thấy AD thô này có độ tinh sạch kỹ thuật khá cao là 91,88%.

Kết hợp tinh chế lượng AD thô trong đợt thí nghiệm này thu được 3,97g AD, độ tinh sạch theo HPLC là 97,28%, đạt hiệu suất tinh chế 83,23%.

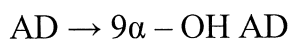
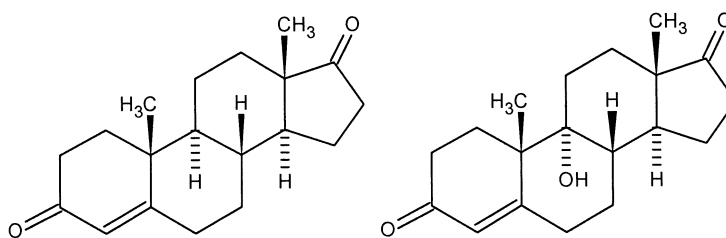
iv) Thí nghiệm 4: Đánh giá khả năng chuyển hóa phytosterol Việt Nam (Ph-VN) trên môi trường của Việt Nam.

Thí nghiệm được tiến hành trên cơ chất phytosterol Việt Nam Ph-VN: Sau 96 giờ chuyển hóa, từ 6g phytosterol tách được 3,9g AD thô, độ tinh sạch kỹ thuật 94,13%. Tinh chế và nhận được 2,84g AD với độ tinh sạch là 99,55% .

Như vậy, môi trường chuyển hóa của Việt Nam sử dụng bột đậu tương mua ngoài thị trường với công thức như nêu trong Bảng 1 là phù hợp nhất đối với chủng *Mycobacterium neoaurum* MN001 trong việc chuyển hóa phytosterol Việt Nam thành AD.

Công đoạn 3: Chuyển hóa vi sinh AD đến 9 α -OH AD bằng chủng vi sinh *Rhodococcus erythropolis* RE001 quy mô phòng thí nghiệm bình tam giác 700mL

Sơ đồ chung:



Sơ đồ 4: Chuyển hóa AD đến 9 α -OH AD sử dụng chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001

Làm giàu chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 trong môi trường nhân giống lần 1 ba ngày ở 29°C, khuấy đảo 220 vòng/phút rồi chuyển sang môi trường nhân giống lần 2 (20%) một ngày ở cùng điều kiện nuôi cấy. Chuyển chủng sang môi trường chuyển hóa (20%) có bổ sung AD (4,0g/L), duy trì một ngày và kiểm tra lượng cơ chất còn dư bằng TLC. Kết thúc quá trình chuyển hoá, dịch nuôi cấy có bổ sung etyl axetat với tỷ lệ tương đương, sau đó được chuyển sang giai đoạn tách chiết tiếp theo để thu nhận sản phẩm. Dưới đây là *Bảng 2* dẫn ra thành phần môi trường nhân giống và chuyển hóa cho chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001:

Môi trường nhân giống	(g/L)	Môi trường chuyển hóa	(g/L)
dịch cao ngô	20	dịch cao ngô	25
glucoza	10	glucoza	5
K ₂ HPO ₄	1	K ₂ HPO ₄	1
		Na ₂ HPO ₄	4,5
pH: 6,8 - 7,2		pH: 7,5	

Bảng 2. Môi trường nhân giống và chuyển hoá của chủng vi sinh Rhodococcus erythropolis RE001

Thử nghiệm chọn cơ chất và môi trường nuôi cấy tối ưu:

i) *Thí nghiệm 1: Thí nghiệm trên môi trường phản ứng của Nga, cơ chất AD Merck*

Quá trình chuyển hoá kết thúc sau 24 giờ. Không quan sát thấy cơ chất còn lại trong dịch nuôi cấy theo TLC. Từ 0,4g cơ chất cho vào môi trường, tách được 0,4g 9 α -OH AD thô có độ tinh sạch kỹ thuật là 78,61%.

ii) *Thí nghiệm 2: Môi trường của Nga, cơ chất AD Merck N^o-1 và AD Việt Nam.*

Quá trình kéo chuyển hoá dài 22 giờ. Theo TLC, cả hai nguồn AD của nước ngoài còn dư dưới 1%. Từ 2,8g AD của Merck N^o-1 tách được 3,04g 9 α -OH AD thô có độ tinh sạch kỹ thuật là 58,77% (HPLC). Từ tổng cộng 3,35g 9 α -OH AD thô, kết hợp với phần thu được ở đợt 1, tinh chế được 2,95g sản phẩm có độ tinh sạch là 96,77% (HPLC), với hiệu suất tinh chế là 87,80%.

Tương tự, từ 0,8g AD của Việt Nam, hiệu suất phản ứng chuyển hóa đạt 100%, thu được 0,89g sản phẩm 9 α -OH AD.

Như vậy, bước chuyển hóa AD đến 9 α -OH AD bằng vi sinh vật theo sáng chế với hiệu suất chuyển hóa đạt $\geq 70 \pm 5\%$, độ tinh sạch sản phẩm $\geq 97\%$ (HPLC) sử dụng chủng vi sinh đột biến *Rhodococcus erythropolis* RE001.

Ngoài phổ HPLC, các sản phẩm AD và 9 α -OH AD còn được giám định bằng Đnc, IR, MS, ^1H - & ^{13}C - NMR.

Công đoạn 4: Chuyển hoá vi sinh AD đến 9 α -OH AD trên thiết bị lên men 5,0L (Mỹ)

Chuẩn bị 1,0L môi trường nhân giống cho chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 (dịch chiết men 20g, glucoza 10g, K_2HPO_4 , pH = 6,8). Song song, chuẩn bị 4L môi trường chuyển hóa trong nồi lên men 5L với các thành phần như sau: dịch chiết men 80g, glucoza 20g, K_2HPO_4 4g, Na_2HPO_4 18g, pH = 7,5. Môi trường được khử trùng ở 118°C, 30 phút và để ở nhiệt độ phòng một ngày trước khi sử dụng.

Chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 được làm giàu trong 200mL môi trường nhân giống lần 1 ba ngày ở 29°C, khuấy đảo 220 vòng/phút rồi chuyển sang 800mL môi trường nhân giống lần 2 (20%) một ngày ở cùng điều kiện nuôi cấy. Chuyển chủng sang 4L môi trường chuyển hóa (20%) có bổ sung cơ chất AD (4,0g/L), duy trì một ngày và kiểm tra lượng cơ chất còn dư bằng TLC. Kết thúc quá trình chuyển hoá, dịch nuôi cấy có bổ sung etyl axetat với tỷ lệ tương đương được chuyển sang việc tách chiết tiếp theo. Độ tinh sạch của sản phẩm tinh chế được đánh giá bằng HPLC.

Tiến hành lên men quy mô 5L lặp lại đối với chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 để oxy hóa AD, tỷ lệ cơ chất đều giữ nguyên 4 g/L, tiếp giống 20%. Tổng môi trường lên men 4L. Quá trình lên men được duy trì như sau: tốc độ khuấy 600 vòng/phút, lưu lượng khí oxy 0,2L/L/ph, nhiệt độ 29°C.

Lên men lần đầu tiên bị dừng ngay sau khi tiếp cơ chất vào môi trường chuyển hóa vì: 1) không sử dụng dầu phá bọt để hạn chế lượng bọt sinh ra, 2) cơ chất sau khi tiếp vào môi trường tạo thành những hạt tinh thể lớn nên không chuyển hóa được cơ chất này. Đợt lên men lần hai, dầu phá bọt được thêm vào trong khi đang tiếp cơ chất để làm tan bọt trong quá trình khuấy. Song song với nồi 5L này, hai bình tam giác 500mL chứa 100mL môi trường chuyển hóa trong mỗi bình cũng được lắc ở tủ lắc 29°C, 220rpm (vòng/phút) ở cùng thời gian trên.

Sau 16 giờ, định tính trên bản mỏng, vạch AD vẫn còn khá đậm ở hai bình tam giác trong khi ở nồi 5L không quan sát thấy vạch này. Như vậy quá trình chuyển hóa ở nồi 5 lít kết thúc sớm hơn nhiều so với hai bình tam giác.

Sau 20 giờ, không quan sát thấy vạch cơ chất nào trên bản mỏng, như vậy quá trình chuyển hóa đã hoàn tất trong bình tam giác.

Ngoài ra, hai bình tam giác khác có cùng công suất như trên cũng được lắc từ một thí nghiệm trước đây và quá trình chuyển hóa cũng diễn ra hoàn toàn nên được gom lại trong quá trình tách chiết cùng với dịch lên men ở thí nghiệm này.

Từ tổng thể tích lên men là 4,4L có 17,6g cơ chất AD tinh chế lần đầu thu được 16,03g 9 α -OH AD thô có độ tinh sạch kỹ thuật là 75,87% (HPLC).

Tiếp tục tinh chế từ sản phẩm thô này thu được 14,52g 9 α -OH AD có độ tinh sạch là 96,68%.

Hiệu suất tinh chế đạt 78,6%, tương đương với 3,3 g/L.

Kết quả cụ thể được trình bày trong *Bảng 3* dưới đây

Thể tích lên men	Cơ chất AD	9α- OH AD thô	Độ tinh sạch kỹ thuật	9α-OH AD tinh chế	Độ tinh sạch (HPLC)	Hiệu suất chuyển hóa theo Mol
(l)	(g)	(g)	(%)	(g)	(%)	(%)
4	16	16,03	75,87	14,52	96,68	78,6
0,4	1,6					

Bảng 3. Kết quả định lượng sản phẩm 9 α -OH AD sau khi lên men quy mô 5,0L

Kết quả phân tích độ tinh sạch của sản phẩm thô, sản phẩm tinh chế và chất chuẩn bằng HPLC được trình bày trong các Hình 3, 4 và 5.

Kết luận: Quy trình theo sáng chế chuyển hóa từ AD thành 9 α -OH AD bằng chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 đạt hiệu suất chuyển hóa 78,6% trên thiết bị lên men 5,0L. Sản phẩm 9 α -OH AD có độ tinh sạch đạt $\geq 97\%$ (HPLC).

Thử nghiệm Triển khai quy trình theo sáng chế chuyển hoá AD đến 9 α -OH AD quy mô pilot trong thiết bị lên men 80L

Nguyên vật liệu, hóa chất:

Hoá chất: đạt tiêu chuẩn thí nghiệm của các hãng Merck và Sigma; AD (Merck & Việt Nam), thiết bị lên men 80L Bioflo 5000 BF-5000 80L(Mỹ), Bản mỏng silica gel 60 F254 Merck dùng để phân tích định tính dịch lên men HPLC của hãng Shimadzu, cột LC18 (25cm x 4,6mm, 5 μ m), đệm H₂O:metanol = 4:6, tốc độ 1mL/phút, bước sóng phát hiện: 240nm.

Chuẩn bị các môi trường:

6L môi trường nhân giống (dịch chiết men 120g, glucoza 60g, K_2HPO_4 6g, pH = 6,8) chia vào 2 bình tam giác công suất 2L mỗi bình 500mL môi trường, và 5L còn lại cho vào thiết bị lên men công suất 10L.

30L môi trường chuyển hóa chứa trong thiết bị lên men 80L (dịch chiết men 600g, glucoza 150g, K_2HPO_4 30g, Na_2HPO_4 135g, pH = 7,2).

Tất cả các môi trường trên được khử trùng ở 118°C trong khoảng thời gian 30 phút và để ở nhiệt độ phòng ba ngày trước khi sử dụng.

Chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 sau khi làm giàu trong môi trường nhân giống được chuyển sang môi trường chuyển hóa có bổ sung cơ chất AD (4g/L) trong nôi 80L. Quá trình lên men được duy trì một ngày. Đánh giá lượng cơ chất còn dư trong môi trường bằng TLC. Kết thúc quá trình chuyển hoá, dịch nuôi cấy có bổ sung etyl axetat với tỷ lệ tương đương để tách sản phẩm. Độ tinh sạch của sản phẩm tinh chế được phân tích bằng hệ thống phổ sắc ký HPLC.

Trên cơ sở nghiên cứu thành công bước chuyển hóa AD sang 9 α -OH AD quy mô 5L, tiếp tục triển khai thử nghiệm công nghệ này lên quy mô pilot 80L trên thiết bị lên men thông dụng. Nhiệt độ nuôi cấy giống và lên men được duy trì ổn định ở 29°C. Trước tiên, làm giàu chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 trong hai bình tam giác 2L mỗi bình chứa 500mL môi trường nhân giống, lắc ở 220 vòng/ phút trong ba ngày sau đó chuyển toàn bộ giống trong hai bình này sang 5L môi trường nhân giống ở thiết bị lên men 10L, nuôi thêm một ngày ở cùng nhiệt độ trên, tốc độ khuấy 500 vòng/phút, lưu lượng khí oxy là 0,2/1/1/ph. Toàn bộ chủng làm giàu trong thiết bị lên men 5 lít được chuyển sang thiết bị lên men 80L chứa 30L môi trường chuyển hóa có bổ sung cơ chất AD (4 g/L) đã chuẩn bị ở phần trên. Khác với hệ thống lên men quy mô 5L, thiết bị lên men 80L không có điện cực đo oxy và tốc độ khuấy tối đa là 550 vòng/phút nên nguồn oxy vô trùng đưa vào thiết bị lên men theo đường ống ở mức độ tối đa và tốc độ khuấy được duy trì ở 500 vòng/phút.

Vì chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 không nhạy cảm nhiều đối với tốc độ khuấy, hơn nữa nguồn cung cấp khí luôn duy trì ở mức độ tối đa nên sau khoảng 10 giờ chuyển hoá, dịch môi trường có sự biến đổi về màu sắc (màu vàng óng) như các thí nghiệm đã nghiên cứu thành công trước đây ở quy mô bình tam giác cũng như quy mô 5 L. Dịch môi trường sau đó được lấy ra định kì qua van thu mẫu để chấm trên bản mỏng sắc ký

cùng với cơ chất AD và chất chuẩn 9 α -OH AD để kiểm tra cơ chất còn dư. Trên bản mỏng cho thấy dịch chiết ở thiết bị lên men 80L chỉ cho một vạch duy nhất tương ứng với vị trí của chất chuẩn 9 α -OH AD. Như vậy, quá trình chuyển hóa đã hoàn tất. Dịch lên men sau đó được bổ sung etyl axetat và chiết lần đầu thu được 93g sản phẩm 9 α -OH AD thô (từ tổng số cơ chất ban đầu 120 g). Độ tinh sạch theo HPLC là 91,55%. Sau khi tinh sạch sản phẩm thô, thu được 88,71g sản phẩm tinh chế, có độ tinh sạch theo HPLC là 96,98 (~97)%. Như vậy hiệu suất tinh chế là 70%. Kết quả cụ thể được trình bày trong *Bảng 4* dưới đây.

Thể tích lên men	Cơ chất AD	Sản phẩm 9α-OH AD thô	Độ tinh sạch kỹ thuật	9α-OH AD tinh chế	Độ tinh sạch (HPLC)	Hiệu suất chuyển hóa theo Mol
(l)	(g)	(g)	(%)	(g)	(%)	(%)
30	120	93	91,55	88,71	96,98	70,00

Bảng 4. Kết quả định lượng sản phẩm 9 α - OH AD sau khi lên men quy mô 80 L

Kết quả phân tích độ tinh sạch của sản phẩm thô, sản phẩm tinh chế và chất chuẩn bằng HPLC được trình bày trong *Hình 6 & 7*

i) Chuẩn bị giống

+ Nuôi cấy chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 trong 1L môi trường nhân giống ở hai bình tam giác 2L, tốc độ khuấy 220 vòng/phút, thời gian 3 ngày.

+ Chuyển chủng sang 5L môi trường nhân giống ở thiết bị lên men 10L, 500 vòng/phút, lưu lượng khí oxy là 0,2/1/ph.

ii) Lên men chuyển hoá cơ chất AD thành 9 α -OH AD

+ Chuyển toàn bộ dịch nuôi cấy trong thiết bị lên men 10L ở bước 1 vào 30L môi trường chuyển hoá trong thiết bị lên men 80 L.

+ Tốc độ khuấy 500 vòng/phút, nhiệt độ lên men 29°C, oxy cung cấp tối đa.

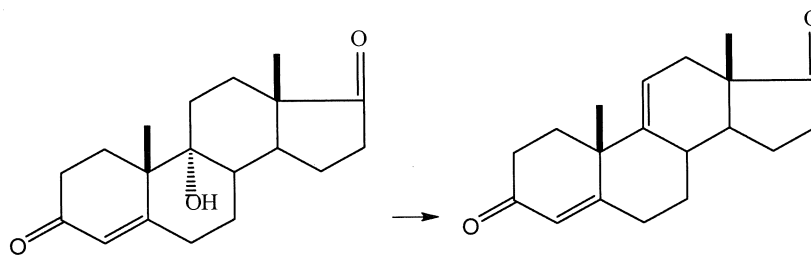
+ Kiểm tra mẫu sau 10 giờ chuyển hoá.

iii) Chiết xuất tinh chế sản phẩm bằng etyl axetat

Kết luận: Quy trình theo sáng chế sử dụng chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 quy mô pilot sản xuất 9 α -OH AD trên thiết bị lên men 80L với hiệu suất chuyển hoá đạt $\geq 70\%$. Sản phẩm tinh khiết 9 α -OH AD có độ tinh sạch đạt $\geq 97\%$ (HPLC).

Công đoạn 4: Tổng hợp $\Delta^{9(11)}$ -androstendion bằng cách dehydrat hóa 9 α -OH AD:

Sơ đồ chung:



9 α -OH AD $\Delta^{9(11)}$ -AD

Sơ đồ 5. Dehydrat hóa 9 α -OH AD

Thử nghiệm lựa chọn tác nhân dehydrat hoá:

i) Phương án lựa chọn 1: Dung dịch gồm 10g 9 α -hydroxy androstendion, 185mL CHCl_3 ($d=1,48$, cất lại ở nhiệt độ sôi) và 36,6mL H_3PO_4 (nồng độ $\geq 85\%$, $d=1,69$) được hồi lưu ở nhiệt độ 60°C trong 2 giờ. Sau 2 giờ khi phản ứng kết thúc, lớp hữu cơ được rửa bằng H_2O đến trị số độ pH = 7. Dung môi được loại bỏ hoàn toàn dưới áp suất giảm, cặn thu được đem kết tinh lại bằng etyl axetat (200mL, thời gian kết tinh: để qua đêm trong tủ lạnh ở nhiệt độ 5°C) thu được 8,93g hợp chất 9(11)-dehydro androstendion sạch, hiệu suất 95%. Nhiệt độ nóng chảy ($^\circ\text{C}$): $204 - 205^\circ\text{C}$

ii) Phương án lựa chọn 2: Tương tự phương án 1 nhưng thay CHCl_3 bằng CHCl_2 (185mL) và đạt hiệu suất 98%

ii) Phương án lựa chọn 3: Tương tự phương án 1 nhưng thay CHCl_3 bằng toluen (20mL) và đạt hiệu suất 98-99%

iii) Phương án lựa chọn 4 : Dùng tác nhân dehydrat hóa là H_2SO_4 (80%, 150mL), dung môi CHCl_2 (185mL), thời gian 2 giờ và đạt hiệu suất 90%.

iv) Phương án lựa chọn 5 : Dung môi benzen, tác nhân dehydrat hóa là HClO_4 (57%, 170ml), thời gian phản ứng 45 phút và đạt hiệu suất 86%.

Tuy nhiên để triển khai vào sản xuất công nghiệp, không nên dùng dung môi thơm độc hại như benzen, toluen.

Phân tích cấu trúc các sản phẩm của quy trình theo sáng chế bằng các phương pháp phổ

Sản phẩm của bước 1: Phytosterol

Phổ IR (KBr, γ , cm^{-1}) cho các peak đặc trưng ở 3433cm^{-1} (ν_{OH}), 1640cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) và các peak đặc trưng ở 2938cm^{-1} của các dao động $\nu_{\text{C-H}}$ (của hệ thống vòng no của phân tử sterol) như được thể hiện trong Hình 8.

Phân tích hỗn hợp phytosterol đầu tương tốt nhất nhờ phổ HPLC- MS được thể hiện trong Hình 9. Trên phổ có 3 peak chính đặc trưng cho 3 phytosterol thành phần điển hình của một hỗn hợp phytosterol đầu tương, đó là: β -sitosterol (39,5%), thời gian lưu: 39,257; stigmasterol (29,56%), thời gian lưu: 36,145; campesterol (24,68%), thời gian lưu: 34,499. Như vậy hàm lượng sterol tổng số của 3 thành phần chính đạt: 93,74%

Phổ MS được thể hiện trong các Hình 10-12: cho những thông tin phù hợp cho từng sterol riêng biệt: phổ MS của peak β -sitosterol (1) cho peak ion phân tử $\text{M}^+ = 414$ tương ứng với β -sitosterol, phổ MS của peak stigmasterol (2) cho peak ion phân tử $\text{M}^+ = 412$ tương ứng với stigmasterol, còn phổ MS của peak campesterol (3) cho peak ion phân tử $\text{M}^+ = 400$ hoàn toàn trùng hợp với trọng lượng phân tử của campesterol.

Sản phẩm của bước 2: Androstendion (AD)

Phổ IR (KBr, γ , cm^{-1}): phổ IR của sản phẩm AD cho các peak đặc trưng ở vùng 2952cm^{-1} ($\gamma_{\text{C-H}}$), 1732cm^{-1} ($\gamma_{\text{C=O}}$) ở vị trí C-17, 1661cm^{-1} ($\gamma_{\text{C=O}}$) ở vị trí C-3, 1615cm^{-1} ($\gamma_{\text{C}=\text{C}}$) ở vị trí C-4).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ) của sản phẩm AD xuất hiện các peak đặc trưng của khung sterol, cộng hưởng ở: 0,9225 ppm (s, 3H, 18-Me); 1,2180 ppm (s, 3H, 19-Me); 5,751 ppm (s, 1H, ^4H).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của AD gồm 19 peak tương ứng với 19 nguyên tử C trong phân tử. Cộng hưởng ở vùng trường thấp là tín hiệu của các nguyên tử C cacbonyl và olefin; cụ thể: độ chuyển dịch hoá học ở 199,13 ppm được gán cho C-17 ($^{17}\text{C}=\text{O}$); 170,27 ppm được gán cho C-3 ($^3\text{C}=\text{O}$); 124,09 ppm được gán cho C-4 (^4C olefin); 77,42 ppm được gán cho C-5 (^5C olefin). Còn lại là vùng cộng hưởng của các nguyên tử C no ở trường cao.

Phổ MS của AD xuất hiện peak ion mạnh $[\text{M}^+]$ có $m/z = 286$ trùng với khối lượng Mol của AD, peak ion mạnh có $m/z = 271$ được giải thích là do có sự tách nhóm methyl khỏi khung phân tử $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.

Phổ HPLC của AD cho thấy sản phẩm có độ tinh sạch cao, thời gian lưu của AD là 12,5 phút.

Sản phẩm của bước 3: 9 α - OH AD

Phổ IR(KBr, γ, cm^{-1}) của 9 α -OH AD ngoài các peak đặc trưng tương tự như phổ IR của AD, cụ thể: ở vùng 2933cm^{-1} ($\gamma_{\text{C-H}}$), 1735cm^{-1} ($\gamma_{\text{C=O}}$ ở vị trí C-17), 1655cm^{-1} ($\gamma_{\text{C=O}}$ ở vị trí C-3), 1614cm^{-1} ($\gamma_{\text{C=C}}$ ở vị trí C-4), còn xuất hiện peak đặc trưng cho dao động hoá trị của nhóm O-H ở 3449cm^{-1} .

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ) của sản phẩm 9 α -OH AD ngoài các tín hiệu cộng hưởng tương tự như phổ $^1\text{H-NMR}$ của AD: 0,923 ppm (s, 3H, 18-Me); 1,351 ppm (s, 3H, 19-Me); 5,891 ppm (s, 1H, ^4H), còn xuất hiện 1 singulet có độ chuyển dịch hoá học 2,41 ppm được quy kết cho proton nhóm O-H (s, 1H, 9 O-H).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của 9 α -OH AD gồm 19 peak tương ứng với 19 nguyên tử C trong phân tử. Cộng hưởng ở vùng trường thấp là tín hiệu của các nguyên tử C cacbonyl và olefin tương tự như phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của AD; cụ thể: độ chuyển dịch hoá học ở 199,04 ppm được gán cho C-17 ($^{17}\text{C=O}$); 168,41 ppm được gán cho C-3 ($^3\text{C=O}$); 126,97 ppm được gán cho C-4 (olefin); 77,37 ppm được gán cho C-5 (olefin) và vùng cộng hưởng của các nguyên tử C no ở trường cao. Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu cộng hưởng có độ chuyển dịch hoá học ở 76,66 ppm được quy kết cho C-9 liên kết với nhóm O-H.

Phổ MS của 9 α -OH AD xuất hiện peak ion mảnh $[\text{M}^+]$ có $m/z = 302$ trùng với khối lượng Mol của 9 α -OH AD, peak ion mảnh có $m/z = 284$ là do có sự tách một phân tử H_2O khỏi khung phân tử $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$.

Phổ HPLC của 9 α -OH AD cho thấy sản phẩm có độ tinh sạch cao, thời gian lưu của 9 α -OH AD là 6 phút.

Sản phẩm cuối: $\Delta^{9(11)}$ -androstendion

Phổ IR (KBr, γ, cm^{-1}) của $\Delta^{9(11)}$ -androstendion mất đi peak đặc trưng của nhóm O-H, tồn tại các peak đặc trưng cho dao động hóa trị của các nhóm cacbonyl ở 1732 và 1659cm^{-1} ($^{17}\text{C=O}$ và $^3\text{C=O}$) và của nối đôi C=C ở 1616 và 1449cm^{-1} .

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ): ngoài các tín hiệu cộng hưởng của các proton H-4 (5,76ppm; singlet tù), nhóm metyl ở vị trí 19 (1,36 ppm; s) và vị trí 18 (0,88 ppm; s) còn xuất hiện 1 multiplet ở 5,57 ppm được gán cho proton olephil ở vị trí 11.

Các Hình 1-7 thể hiện phổ HPLC của các sản phẩm AD, 9 α -OH AD của quy trình theo sáng chế.

Những lợi ích (hiệu quả) có thể đạt được

Quy trình theo sáng chế giúp thu được các hợp chất steroid gồm phytosterol, androstendion (AD), 9 α -hydroxy androstendion (9 α -OH AD) và androst-4,9(11)-dien-3,17-dion ($\Delta^{9(11)}$ - AD) hiệu suất cao, tinh chế đơn giản, sản phẩm tinh khiết đạt tiêu chuẩn dược dụng, hiệu quả khả thi để triển khai vào sản xuất ở quy mô công nghiệp; là nguyên liệu ban đầu để sản xuất thực phẩm chức năng và các loại thuốc hormon steroid khác có nhu cầu và yêu cầu sản lượng ngày càng lớn trên thế giới mà Việt Nam hiện đa phần phải nhập khẩu do không có nguyên liệu đầu và công nghệ tổng hợp. Quy trình theo sáng chế sản xuất tận dụng phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương, nguồn nguyên liệu mới dồi dào thế giới, thế mạnh của Việt Nam – một nước nông nghiệp nhiệt đới hàng năm sản xuất và tiêu thụ hàng trăm nghìn tấn (~ triệu tấn), hiện đang được chính phủ khuyến khích phát triển.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hợp chất androst-4,9(11)-dien-3,17-dion từ phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương bao gồm các bước:

(i) thủy phân phụ phẩm công nghiệp tinh luyện dầu đậu tương bằng dung dịch NaOH 50%, bổ sung ancol bậc thấp nồng độ 30-70% và trung hòa bằng dung dịch axit H_2SO_4 25% để thu được dịch dầu sterol thô, tinh chế dịch dầu sterol thô để thu phytosterol bằng phương pháp kết tinh chọn lọc sử dụng dung môi hữu cơ $(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{MeOH}$ 96%/ H_2O theo tỷ lệ 50:40:10 (v/v/v);

(ii) bổ sung phytosterol thu được từ bước (i) vào môi trường chuyển hoá chứa 10% dịch nuôi cấy chủng *Mycobacterium neoaurum* MN001 có số nộp lưu MN001 tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam theo tỷ lệ 1% (khối lượng/thể tích), nuôi ở 29°C, tốc độ khuấy 220 vòng/phút trong thời gian 3 ngày, tách chiết và tinh chế để thu được androstendion,

trong đó dịch nuôi cấy chủng *Mycobacterium neoaurum* MN001 thu được sau khi nuôi cấy 4 ngày trong môi trường nhân giống bao gồm (g/L): 10g glucoza, 3g bột đậu tương không loại béo, 2g bột đậu tương loại béo, 2,2g axit xitric, 0,5g u-rê, 1,0g NH_4Cl , 0,5g K_2HPO_4 , 0,5g MgSO_4 , 0,05g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5g CaCO_3 ở pH là 6,8 - 7,2,

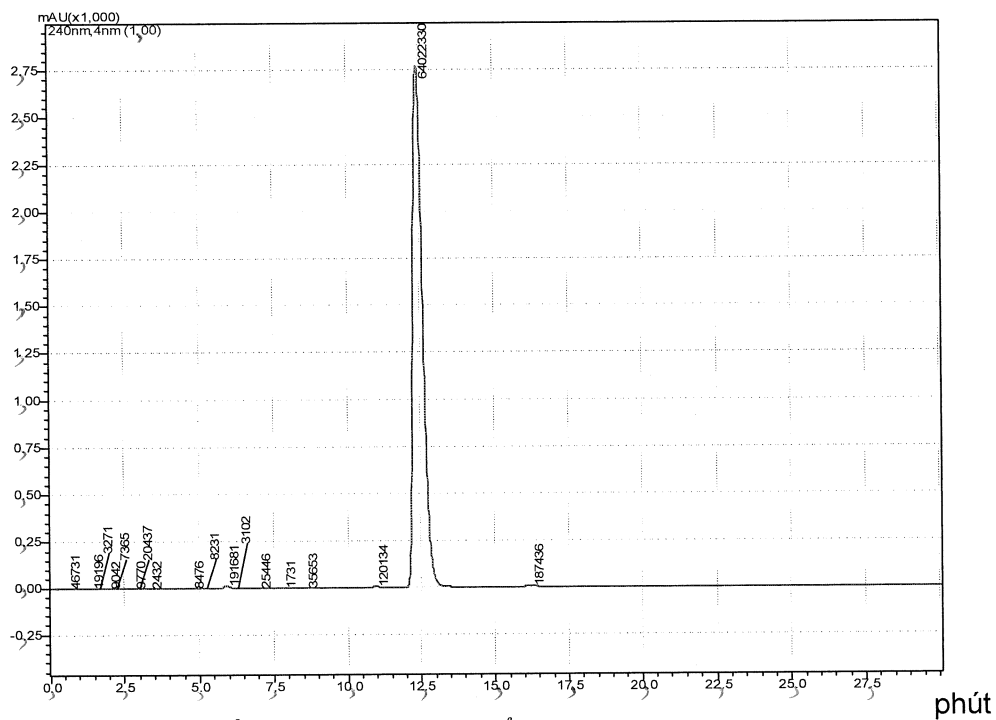
trong đó môi trường chuyển hoá bao gồm (g/L): 20g glucoza, 10g bột đậu tương không loại béo, 5g bột đậu tương loại béo, 2,2g axit xitric, 1,5g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,5g u-rê, 0,5g MgSO_4 , 0,05g FeSO_4 , 3g CaCO_3 ở pH là 6,8 - 7,2;

(iii) bổ sung chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 có số nộp lưu RE001 tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào androstendion thu được từ bước (ii) để thu được 9 α -hydroxy androstendion,

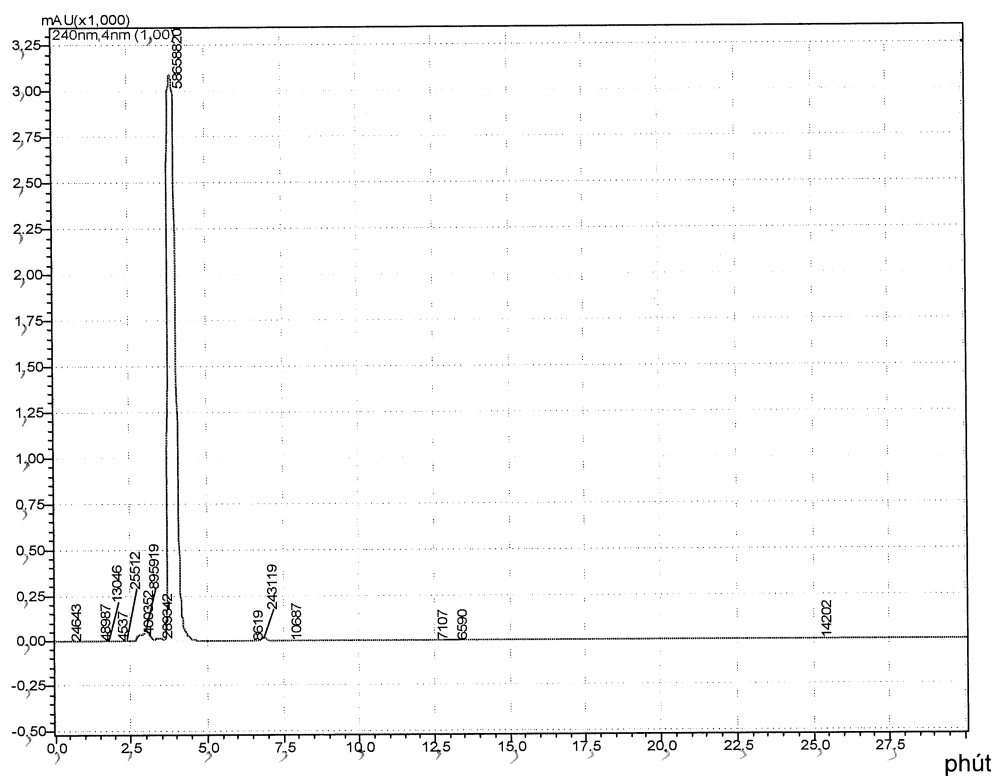
trong đó dịch nuôi cấy chủng *Rhodococcus erythropolis* RE001 thu được sau khi nuôi cấy ba ngày ở 29°C, tốc độ khuấy 220 vòng/phút trong môi trường nhân giống, sau đó chuyển 20% dịch nuôi cấy sang môi trường nhân giống và tiếp tục nuôi cấy một ngày ở 29°C, tốc độ khuấy 220 vòng/phút, môi trường nhân giống bao gồm (g/L): 20g dịch cao ngô, 10g glucoza, 1g K_2HPO_4 ở pH là 6,8 - 7,2

trong đó môi trường chuyển hoá bao gồm (g/L): 25g dịch cao ngô, 5g glucoza, 1g K_2HPO_4 , 4,5g Na_2HPO_4 ở pH là 7,5; và

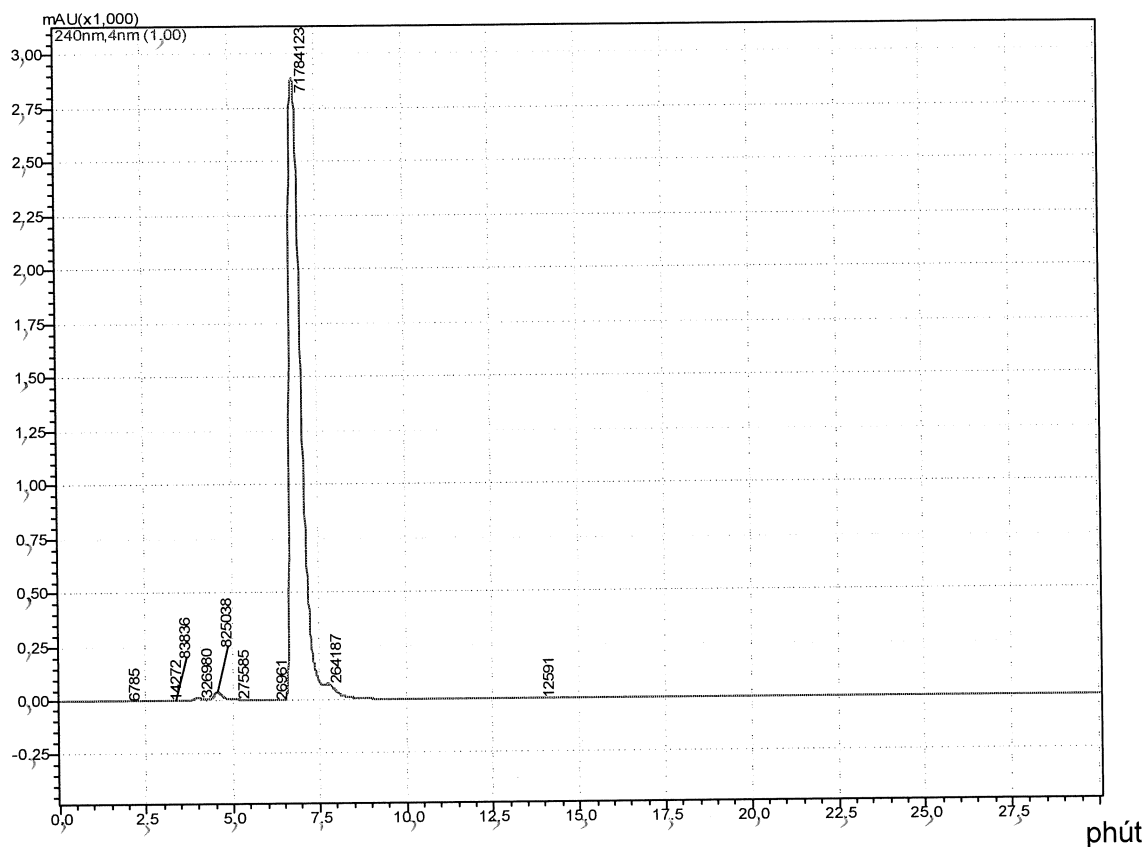
(iv) dehydrat hóa 9 α -hydroxy androstendion thu được từ bước (iii) sử dụng axit vô cơ được chọn từ nhóm bao gồm H_2SO_4 , H_3PO_4 , $HClO_4$ trong dung môi hữu cơ không proton để thu được androst-4,9(11)-dien-3,17-dion.



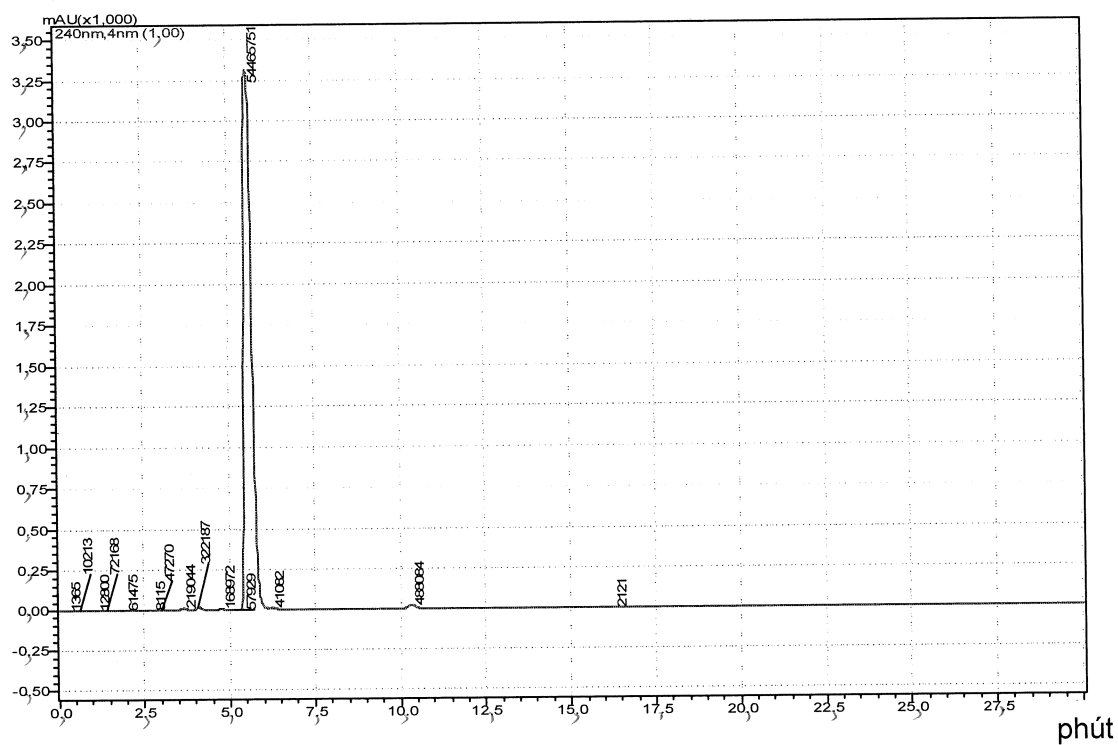
Hình 1. Phổ HPLC của sản phẩm AD độ tinh sạch ~ 100%



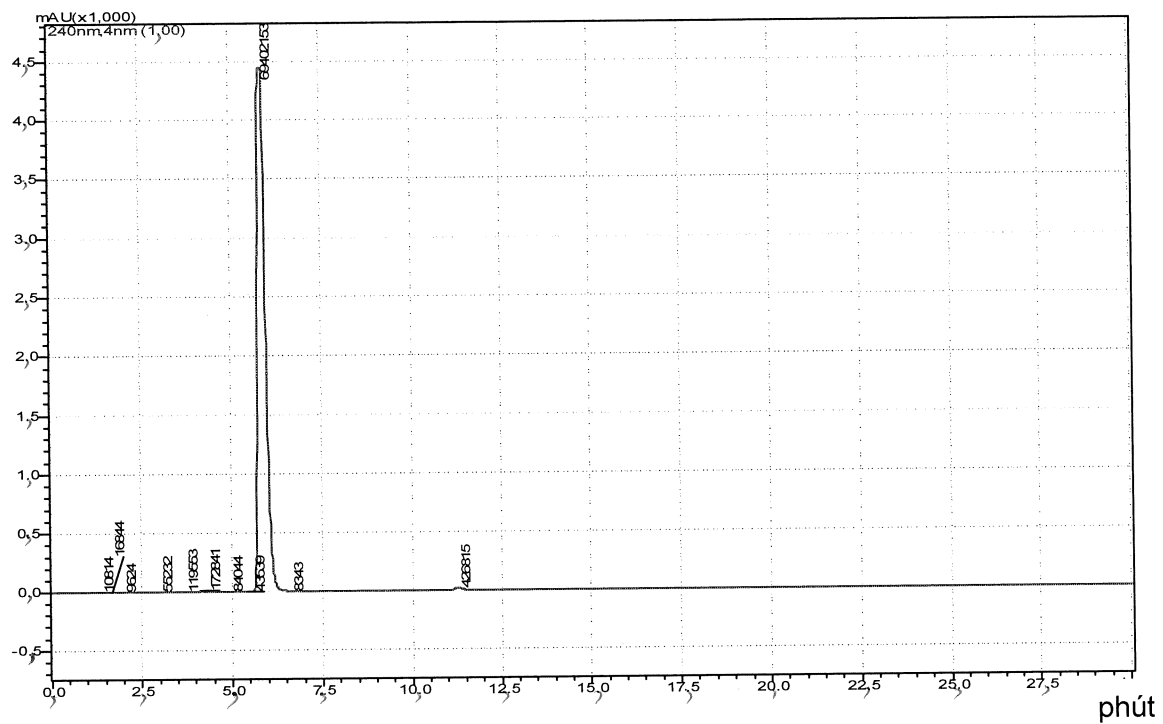
Hình 2. Phổ HPLC của sản phẩm 9α - OH AD độ tinh sạch ~ 100%



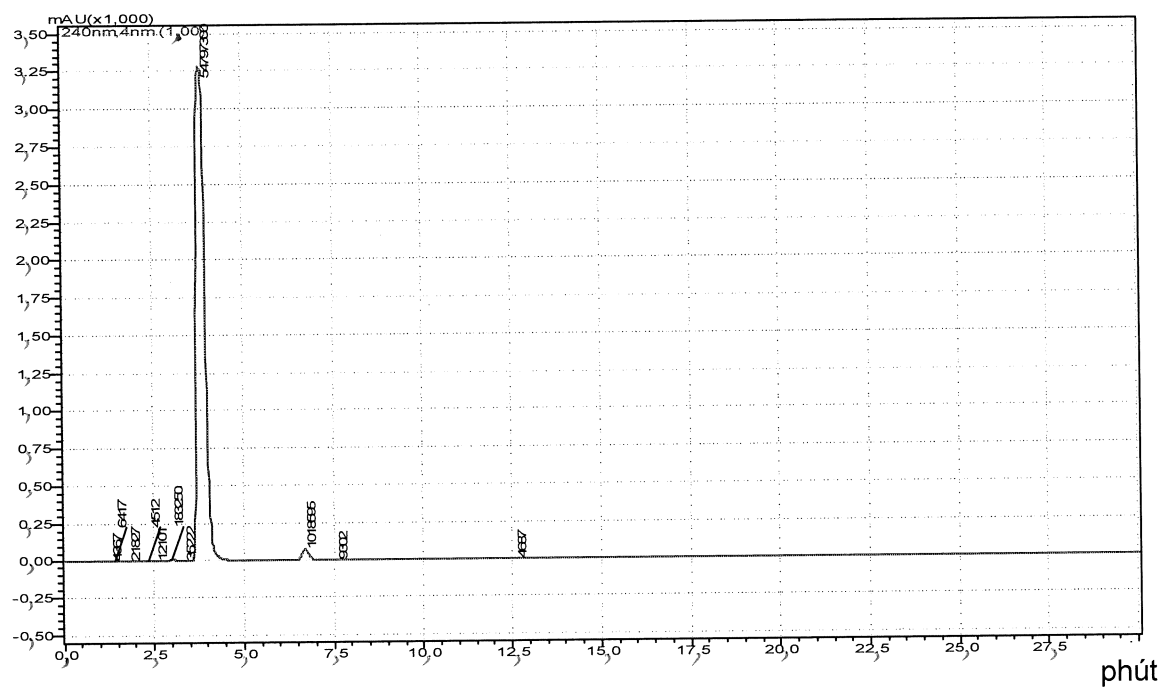
Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn 9α -OH AD



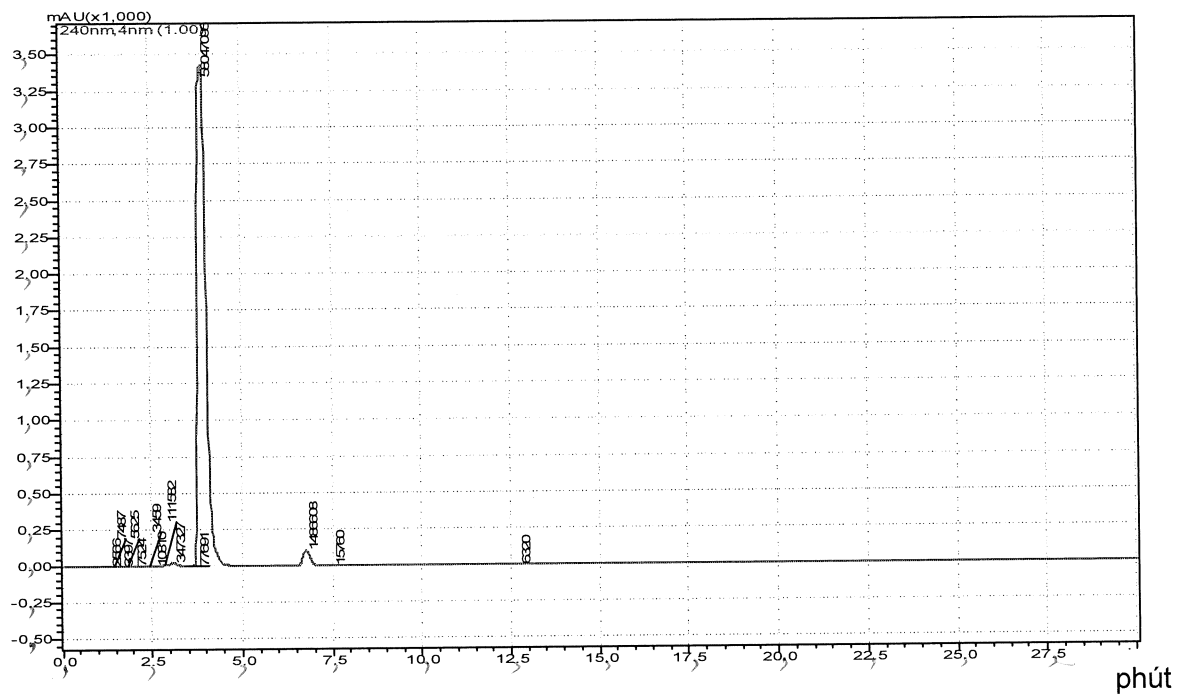
Hình 4. Sắc ký đồ HPLC của sản phẩm thô 9α -OH AD quy mô 5,0L



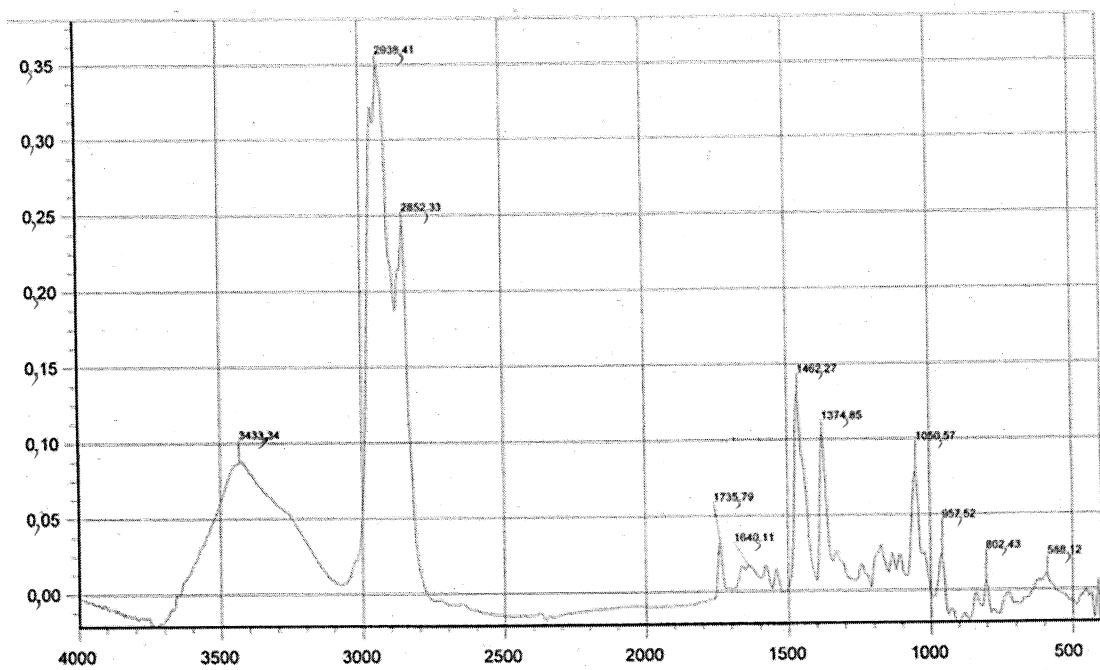
Hình 5. Sắc ký đồ HPLC của sản phẩm tinh chế 9α -OH AD quy mô 5,0L



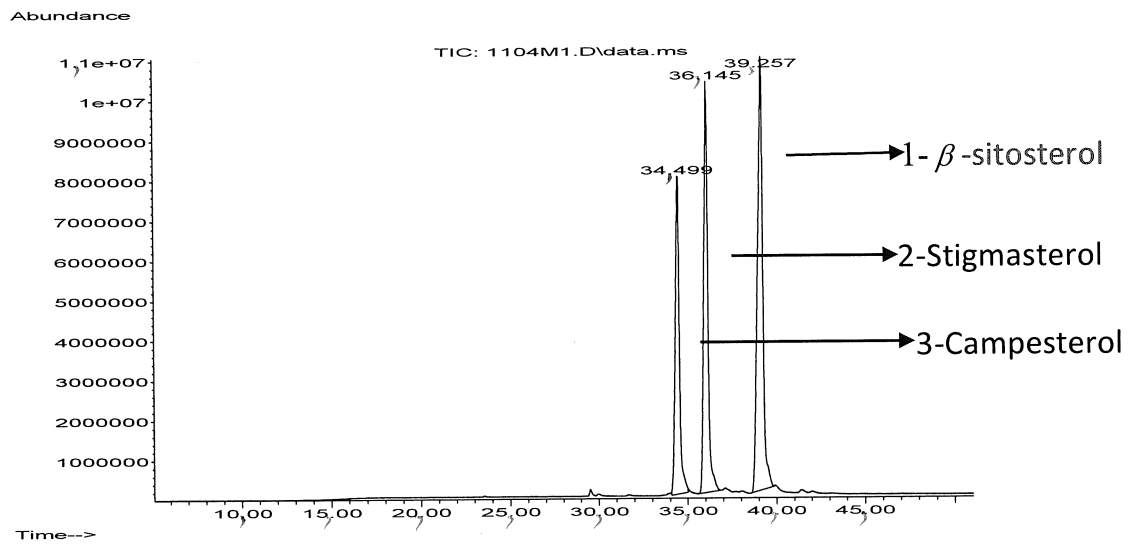
Hình 6. Phổ HPLC phẩm thô 9α -OH AD quy mô 80L



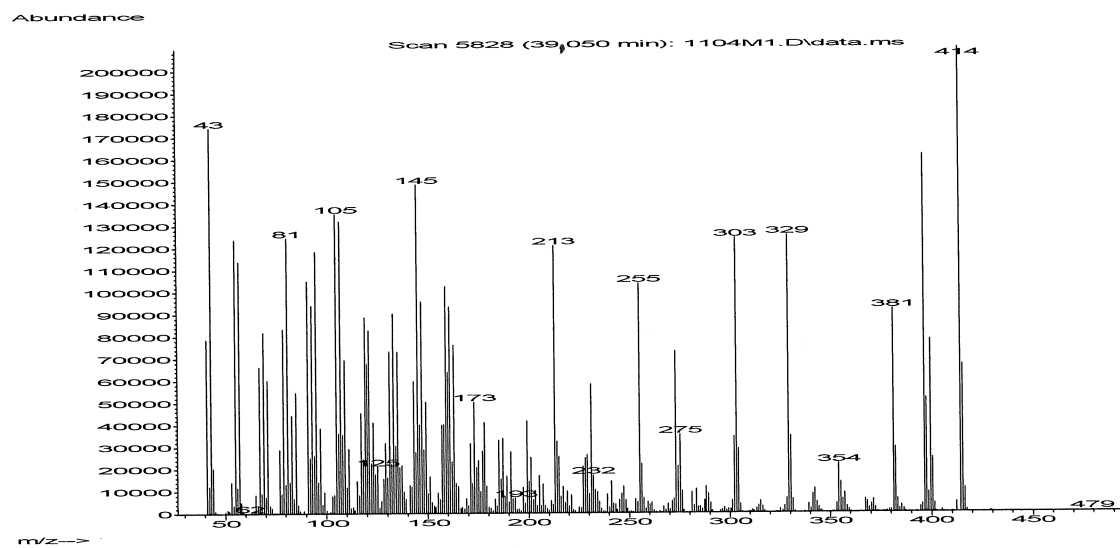
Hình7. Phổ HPLC của sản phẩm 9 α -OH AD quy mô 80L



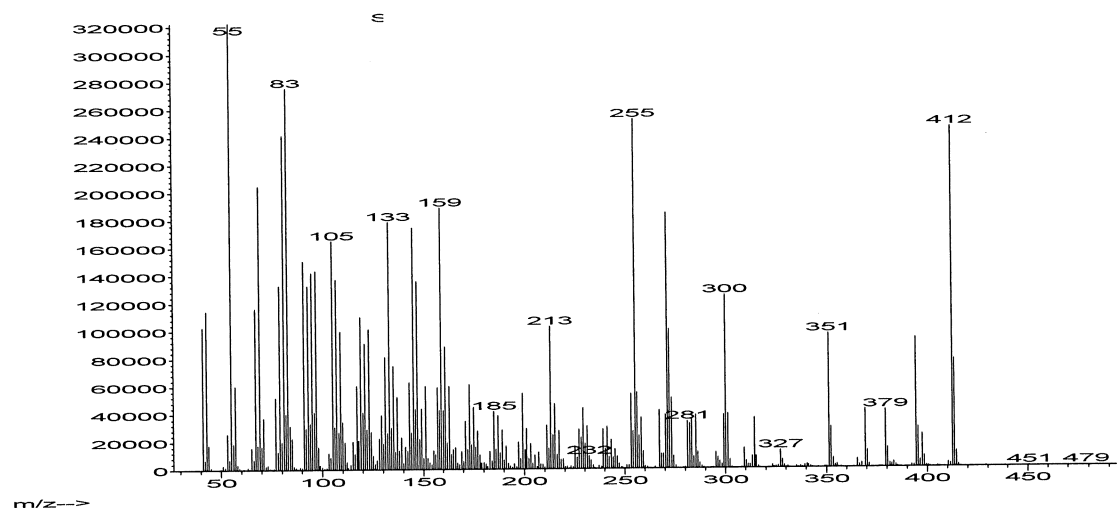
Hình 8. Phổ IR của hỗn hợp phytosterol đậu tương phân lập từ phụ thải công nghiệp dầu đậu tương Cái lân- Q. Ninh



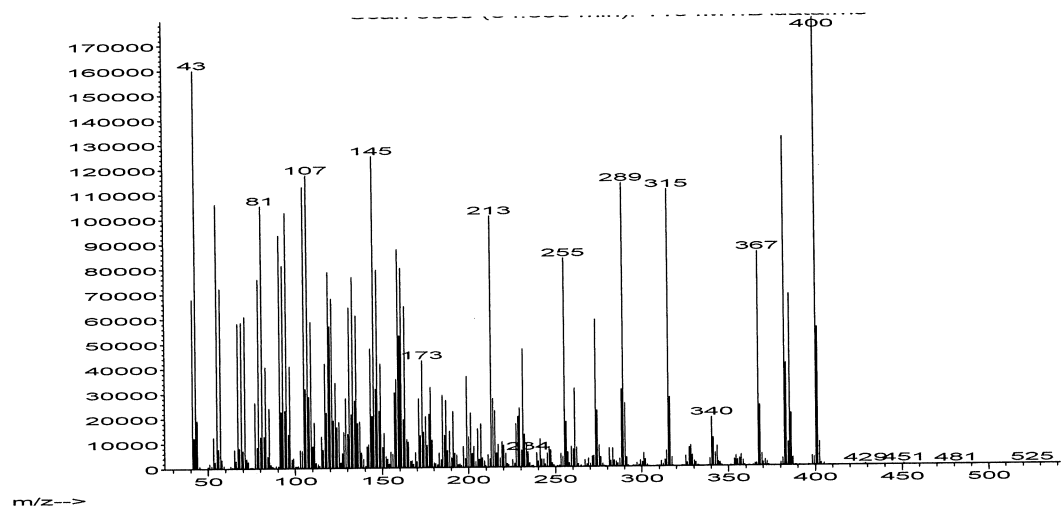
Hình 9. Phổ HPLC của hỗn hợp phytosterol
phân lập từ phụ phẩm công nghiệp dầu đậu tương Cái lân - Quảng ninh



Hình 10. Phổ MS của thành phần β-Sitosterol



Hình 11. Phổ MS của thành phần Stigmasterol



Hình 12. Phổ MS của thành phần Campesterol